

EXTRAÇÃO DE DNA DE FOLHAS DE PINHÃO – MANSO EM DIFERENTES ESTÁDIOS DE DESENVOLVIMENTO

Haritanna Lustosa da Silva, Estudante da UESPI, tanna.lustosa@hotmail.com

Jadson Emanuel Lopes Antunes, UFPI, jadsonemanuel@gmail.com

Eugênio Celso Emérito Araujo, Embrapa Meio-Norte, emerito@cpamn.embrapa.br

Fábio Mendonça Diniz, Embrapa Meio-Norte, fmd1@cpamn.embrapa.br

Valdomiro Aurélio B. de Souza, valdo@cpamn.embrapa.br

Paulo Sarmanho da Costa Lima, sarmanho@cpamn.embrapa.br

RESUMO: O pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) pelas potencialidades de seu cultivo sob condições de estresses bióticos e abióticos, por apresentar longo ciclo produtivo o que contribui para a conservação do solo e para redução do custo de produção que é importante para sua viabilidade econômica, especialmente na agricultura familiar e pelo alto teor de óleo é considerado uma alternativa para produção de biodiesel. Apesar das inúmeras ferramentas que a Biologia Molecular proporciona e que podem ser utilizadas para aprofundar os conhecimentos sobre o pinhão-manso e viabilizar o seu cultivo racional de forma a aproveitar todo seu potencial como fornecedor de matéria prima para biodiesel, pesquisas nesta área do conhecimento com pinhão-manso são incipientes. Sabe-se que para o desenvolvimento de trabalhos na área de biologia molecular é essencial a disponibilidade de DNA de boa qualidade e em concentração adequada. Este trabalho teve como objetivo avaliar a extração de DNA a partir de folhas em 4 estádios de desenvolvimento. As concentrações médias de DNA determinadas por espectrofotometria das amostras provenientes dos quatro tratamentos não diferiram significativamente entre si ao nível de 0,01% de probabilidade. As extrações provenientes das folhas mais jovens (folha vermelho-vinho e folha verde-claro) apresentaram as maiores concentrações de DNA, não diferindo entre si e superaram significativamente as concentrações obtidas a partir das demais amostras de folhas, com tendência de diminuição da concentração de DNA conforme o avanço do estágio de desenvolvimento das folhas. A pureza do DNA obedeceu também a mesma tendência de redução, o que leva a conclusão de que as folhas mais jovens, com coloração vermelho-vinho e verde-claro, são as mais indicadas para a realização das extrações.

Palavras-Chave: Amostras; Concentração; Pureza; DNA.

INTRODUÇÃO

A vigência da lei 11.097 de 13/01/2005, que dispõe sobre a adição de biodiesel ao óleo diesel a partir do ano de 2008 tem provocado a busca de fontes para este combustível renovável. Entre as alternativas destaca-se o pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) pelas potencialidades de seu cultivo sob condições de estresses bióticos e abióticos, por apresentar longo ciclo produtivo o que contribui para a conservação do solo e para redução do custo de produção que é importante para sua viabilidade econômica, especialmente na agricultura familiar, pelo alto teor de óleo que atinge até 67% quando extraído por combinação dos métodos enzimáticos e ultra-sônico e por ser considerado de baixa viscosidade (SHAN et al., 2005).

No Brasil, o pinhão-manso ocorre praticamente em todas as regiões, sobretudo nos estados da região Nordeste e em Goiás e Minas Gerais, sendo encontrado sempre de forma dispersa adaptando-se as condições edafoclimáticas das mais variáveis (SATURNINO et al., 2005).

Apesar das inúmeras ferramentas que a Biologia Molecular proporciona e que podem ser utilizadas para aprofundar os conhecimentos sobre o pinhão-manso e viabilizar o seu cultivo racional de forma a aproveitar todo seu potencial como fornecedor de matéria prima para ser adicionada ao biodiesel, pesquisas nesta área do conhecimento com pinhão-manso são incipientes. Sabe-se que para o desenvolvimento de trabalhos na área de biologia molecular é essencial a disponibilidade de DNA de boa qualidade e em concentração adequada. Portanto, é necessário pleno domínio quanto aos procedimentos de extração para que se possa disponibilizar DNA para atender as demandas provenientes de projetos que envolvem estudos da diversidade de acessos provenientes de coletas que estão sendo realizadas em todo Brasil em face da necessidade da implantação de programas de melhoramento com a espécie.

Como estão previstos grande numero de extrações, os kits são uma boa alternativa mesmo a despeito do alto custo, em razão de possibilitarem a extração de forma mais rápida, além de soluções padronizadas que removem com grande eficiência compostos fenólicos e polissacarídeos.

Este trabalho teve como objetivo avaliar a extração de DNA por meio de um kit comercial “Puregene DNA Isolation” a partir de folhas cujas colorações definiam o estágio de desenvolvimento no final do período de repouso vegetativo do pinhão-manso.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram coletadas folhas em quatro diferentes estádios de desenvolvimento (folha vermelho-vinho, folha verde-claro, folha verde-brilhante e folha verde) de plantas em final de repouso vegetativo (Figura 01).



Figura 01: Tipos de folhas utilizadas na extração de DNA de pinhão-manso. 1-Folha vermelho-vinho; 2-Folha verde-claro; 3-Folha verde-brilhante; 4-Folha Verde

As folhas foram acondicionadas em sacos plásticos e transportadas até o Laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Meio-Norte. A extração foi realizada conforme recomendações do manual do Kit “Puregene DNA Isolation”, partindo de amostras de folhas frescas maceradas em nitrogênio líquido, pesando 30 mg cada uma das amostras, que foram homogeneizadas em tubos de microcentrifuga de 1,5 mL. A este material foi adicionado 300 μ L da solução de lise celular e incubou-se a 65°C em banho-maria por uma hora. Foi adicionado 1,5 μ L RNase, na concentração de 10 mg/mL incubando-se por uma hora e, em seguida, deixando-se em repouso em temperatura ambiente por 20 minutos. Depois foram adicionados 100 μ L de solução de precipitação de proteínas, homogeneizando-se, centrifugou-se por 3 minutos a 17350 x g e o sobrenadante foi transferido para novos tubos aos quais foram adicionados 300 μ L de isopropanol a 100% (2-propanol). Centrifugou-se novamente por 90 segundos a 17350 x g descartou-se o sobrenadante e lavou-se com 300 μ L de etanol 70% gelado. Centrifugou-se novamente por 1 minuto a 17350 x g, descartando o sobrenadante e em seguida os tubos foram invertidos em papel absorvente por 15 minutos. Adicionou-se 50 μ L de solução de hidratação de DNA e, após incubação a 65°C por uma

hora, centrifugou-se a 17350 x g por 10 minutos, transferindo o sobrenadante para um tubo novo. O DNA foi estocado a -20°C.

A concentração e a qualidade das extrações de DNA foram determinadas em espectrofotômetro Nanodrop de espectro completo (220 a 750nm). A estimativa da concentração e verificação da integridade das extrações de DNA foi realizada também por eletroforese com gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio, utilizando como padrão de análise o DNA- λ diluído na concentração de 100 ng/ μ L.

Para análise dos dados foi usado o delineamento inteiramente casualizado com quatro tratamentos (estádios de desenvolvimento das folhas) e oito repetições na quantificação em espectrofotômetro e quatro repetições para a quantificação em gel. Os resultados foram submetidos a análise de variância e as médias de cada tratamento para cada variável foram comparadas pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As concentrações médias de DNA determinadas por espectrofotometria das amostras provenientes dos quatro tratamentos não diferiram significativamente entre si ao nível de 0,01% de probabilidade (Tabela 1).

Tabela 1: Quantificação e pureza das amostras de DNA genômico de pinhão-mansão.

Tratamentos	Concentração por Espectrofotometria (ng/μL)	Concentração em Gel de agarose (ng/μL)	Razão 260/280	Razão 260/230
Folha verde-vinho	405,6a	37,5a	1.65a	0.92a
Folha verde-claro	595,7a	34,7a	1.54 b	0.57 b
Folha verde-brilhante	417,6a	12,6 b	1.31 c	0.56 b
Folha verde-escuro	397,7a	5,4 b	0.98 d	0.51 b

¹Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Duncan

Em relação às concentrações obtidas por quantificação em gel de agarose (Figura 02) as extrações provenientes das folhas mais jovens (folha vermelho-vinho e folha verde-claro) apresentaram as maiores concentrações de DNA, não diferindo entre si e superaram significativamente as concentrações obtidas a partir das demais amostras de folhas, com tendência de diminuição da concentração de DNA conforme o avanço do estágio de desenvolvimento das folhas. Observou-se no gel a presença de rastro de manchas “smear” indicando a ocorrência de degradação do DNA atribuída à realização de centrifugações sem refrigeração que não minimizam a ação de DNases.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18

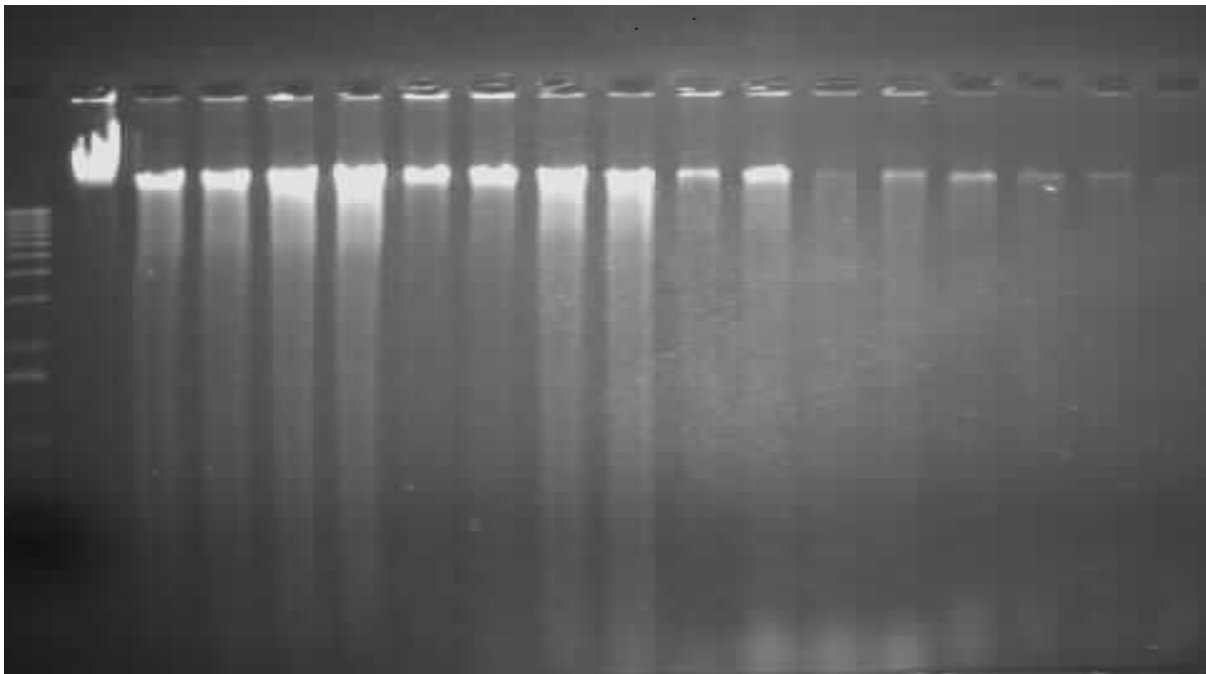


Figura 2: Eletroforograma das amostras de DNA de pinhão-mansão obtidas de folhas em diferentes estágios de crescimento. Canaleta 1-1Kb; Canaleta 2-DNA λ 100 (3 μ L). Canaletas 3 a 6 DNA extraído de folha verde-vinho; Canaletas 7 a 10 DNA extraído de folha verde-claro; Canaletas 11 a 14 DNA extraído de folha verde-brilhante; Canaletas 15 a 18 DNA extraído de folha verde.

As diferenças nas concentrações de DNA estimadas pelos dois métodos podem ser atribuídas à subjetividade da quantificação em gel e a inespecificidade da leitura por espectrofotometria que na absorbância de 260nm não exclui o RNA, além de incluir fragmentos do DNA genômico provenientes do processo de extração.

A pureza do DNA obtido pela razão 260/280 obedeceu também a mesma tendência de redução em função do estágio de desenvolvimento das folhas, observada na concentração

quando quantificada em gel de agarose que, segundo Sharma et al (2000) ocorre em razão do aumento de polifenóis, taninos e polissacarídeos conforme o avanço da maturidade das folhas que prejudica a qualidade do DNA e conseqüentemente a sua concentração. Tendência semelhante observa-se quanto à razão 260/230 que é considerada referencial secundário de pureza, indicando a presença de resíduos de componentes orgânicos na extração.

Os tratamentos em que foram utilizadas as folhas mais jovens (folha vermelho-vinho e folha verde-claro) para extração, a pureza do DNA diferiu significativamente em relação aos demais tratamentos, apesar de não ter atingido o grau de pureza ideal que situa-se no intervalo de 1,8-2,0. Isto indica que há necessidade de mais um tratamento com a solução de precipitação de proteínas e a lavagem com etanol 70% com objetivo de remover resíduos de proteína e outras impurezas.

Os tratamentos em que foram utilizadas as folhas mais jovens (folha vermelho-vinho e folha verde-claro) para extração, a pureza do DNA diferiu significativamente em relação aos demais tratamentos, apesar de não ter atingido o grau de pureza ideal que situa-se no intervalo de 1,8-2,0 necessitando de mais um tratamento com a solução de precipitação de proteínas e a lavagem com etanol 70% com objetivo de remover resíduos de proteína e outras impurezas.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos a partir dos métodos de quantificação indicaram quanto aos parâmetros da qualidade e de concentração do DNA que as folhas mais jovens, com coloração vermelho-vinho e verde-claro, são as mais indicadas para a realização das extrações, possibilitando o uso de folhas para extrações mesmo no período de repouso da planta. Sendo necessário no caso das folhas vermelho-vinho tratamento com a solução de precipitação de proteína e lavagem com etanol 70% com objetivo de melhorar o grau de pureza das extrações.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

SHAN, S.; SHARMA, A.; GUPTA, M.N. Extraction of oil from *Jatropha curcas* L. seed kernels by combination of ultrasonication and aqueous enzymatic oil extraction. **Bioresource Technology**, 96, p. 121-123, 2005.

SHARMA, K. K.; LAVANYA, M.; ANJIAH, V. A Method for Isolation and Purification of Peanut Genomic DNA Suitable for Analytical Application. **Plant Molecular Biology Reporter**, 18, p.393a-393h, 2000.

SATURNINO , H . M. ; PACHECO , D. D. ; KAKIDA , J. ; TOMINAGA , N . ;
GONÇALVES , N. P. Cultura do pinhão –manso (*Jatropha curcas* L.). **Informe**
Agropecuário, Belo Horizonte , v. 26 , n. 229, p. 44 – 78 , 2005.